

glúcidos o de las grasas en los tejidos animales. No obstante, puesto que los aminoácidos y los nucleótidos deben fabricarse en unas proporciones correctas y a un ritmo adecuado para la síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos, sus rutas biosintéticas deben estar reguladas y coordinadas entre sí de forma precisa. Las concentraciones de aminoácidos y nucleótidos, que son moléculas cargadas, también tienen que regularse para mantener el equilibrio electroquímico en la célula. Tal como se ha comentado en capítulos anteriores, las rutas metabólicas pueden estar reguladas tanto por cambios en la actividad como por la cantidad disponible de enzimas específicos. Las rutas que se presentan en este capítulo proporcionan algunos de los ejemplos mejor conocidos de la regulación de la actividad enzimática. El control de las *cantidades* de los diferentes enzimas en una célula (es decir, de su síntesis y degradación) se trata en el Capítulo 28.

22.1 Aspectos generales del metabolismo del nitrógeno

Las rutas biosintéticas que conducen a los aminoácidos y a los nucleótidos comparten la necesidad de nitrógeno. Por lo general, los compuestos de nitrógeno solubles y utilizables biológicamente escasean en el entorno natural. Por este motivo, la mayor parte de organismos mantienen una estricta economía en el uso del amoníaco, los aminoácidos y los nucleótidos. Veremos, en efecto, que los aminoácidos libres, las purinas y las pirimidinas formados durante el recambio metabólico a menudo son recuperados y reutilizados. En primer lugar examinaremos las vías por las cuales se introduce el nitrógeno del medio en los sistemas biológicos.

El ciclo del nitrógeno mantiene una reserva de nitrógeno disponible biológicamente

La forma más abundante de nitrógeno es el aire, que en sus cuatro quintas partes es nitrógeno molecular (N_2). A pesar de ello, relativamente pocas especies pueden convertir el nitrógeno atmosférico en formas utilizables por los organismos vivos. En la biosfera, los procesos metabólicos de las diferentes especies actúan de forma interdependiente para recuperar y reutilizar el nitrógeno disponible biológicamente en un amplio **ciclo del nitrógeno** (Fig. 22-1). El primer paso en el ciclo del nitrógeno consiste en la **fijación** (reducción) del nitrógeno atmosférico por bacterias fijadoras de nitrógeno para proporcionar amoníaco (NH_3 o NH_4^+). Aunque el amoníaco puede ser utilizado por la mayor parte de organismos vivos, las bacterias del suelo, que obtienen su energía de la oxidación del amoníaco a nitrito (NO_2^-) y finalmente a nitrato (NO_3^-), son tan abundantes y activas que prácticamente todo el amoníaco que alcanza el suelo se oxida a nitrato. Este proceso se conoce como **nitrificación**. Las plantas y muchas bacterias pueden incorporar y reducir fácilmente nitrato y nitrito por acción de las nitrato y nitrito reductasas. El amoníaco así formado es incorporado a los aminoácidos por las plantas. Los animales usan a su vez las plantas como fuente de aminoácidos, tanto esenciales como no esenciales, para fabricar sus proteínas. Cuando

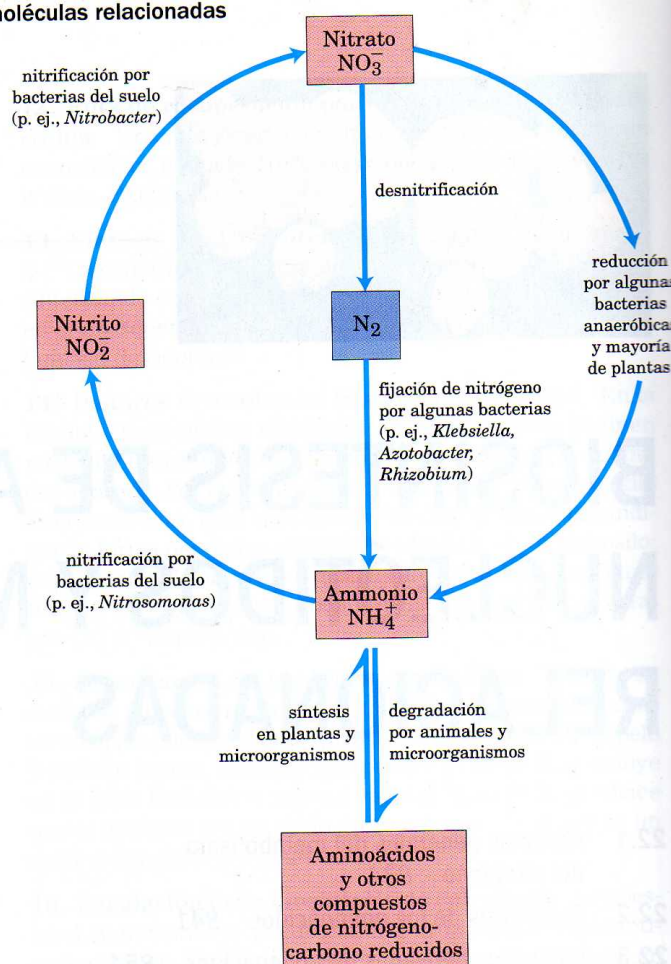


FIGURA 22-1 El ciclo del nitrógeno. La cantidad total de nitrógeno fijado anualmente en la biosfera excede los 10^{11} kg.

los organismos mueren, la degradación microbiana de sus proteínas devuelve el amoníaco al suelo, donde bacterias nitrificantes lo convierten de nuevo en nitrito y nitrato. Las bacterias que convierten el nitrato en N_2 en condiciones anaeróbicas mantienen un equilibrio entre el nitrógeno fijado y el nitrógeno atmosférico, un proceso que se denomina **desnitrificación** (Fig. 22-1). Estas bacterias del suelo utilizan NO_3^- en lugar de O_2 como aceptor final de electrones en una serie de reacciones que (al igual que la fosforilación oxidativa) generan un gradiente transmembrana de protones, que se aprovecha para sintetizar ATP.

A continuación examinaremos el proceso de fijación del nitrógeno, que es el primer paso del ciclo del nitrógeno.

El nitrógeno es fijado por enzimas del complejo de la nitrogenasa

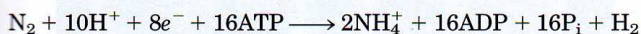
Tan sólo algunos procariotas pueden fijar el nitrógeno atmosférico. Entre ellos se encuentran las cianobacterias del suelo y de las aguas dulces y saladas, otros tipos de bacterias del suelo, tales como algunas especies de *Azotobacter*, y las bacterias fijadoras de nitrógeno que viven como **simbiontes** en los nódulos de las raíces de las plantas leguminosas. El primer producto importante de la fijación del nitrógeno es el amoníaco, que puede ser utilizado por todos los organismos, ya sea

directamente o tras su conversión en otros compuestos solubles, tales como nitritos, nitratos o aminoácidos.

La reducción del nitrógeno a amoníaco es una reacción exergónica:



Sin embargo, el triple enlace $\text{N}\equiv\text{N}$ es muy estable, con una energía de enlace de 930 kJ/mol. La fijación del nitrógeno tiene, por tanto, una energía de activación extremadamente alta, con lo que el nitrógeno atmosférico es prácticamente inerte en condiciones normales. El amoníaco se produce industrialmente por el procedimiento de Haber (llamado así porque su descubridor fue Fritz Haber), que requiere temperaturas de entre 400 y 500 °C y presiones de nitrógeno e hidrógeno de decenas de miles de kilopascales (varios centenares de atmósferas) para conseguir la energía de activación necesaria. Sin embargo, la fijación biológica del nitrógeno ha de tener lugar a temperaturas biológicas y a 0,8 atm de nitrógeno, superándose la elevada barrera de activación por otros medios. Esto se consigue, al menos en parte, por la unión y la hidrólisis del ATP. La reacción global puede escribirse así



La fijación biológica de nitrógeno es realizada por un complejo de proteínas muy conservado, denominado **complejo de la nitrógenasa** (Fig. 22-2). Los componentes clave de este complejo son la **dinitrogenasa reductasa** y la **dinitrogenasa** (Fig. 22-3). La dinitrogenasa reductasa (M_r 60.000) es un dímero formado por dos subunidades idénticas. Contiene un único centro redox de tipo 4Fe-4S (véase Fig. 19-5), unido entre las subunidades, que puede ser oxidado y reducido por un electrón. Tiene también dos sitios de unión de ATP/ADP (un sitio en cada subunidad). La dinitrogenasa (M_r 240.000) es un tetrámero formado por dos copias de dos subunidades distintas. La dinitrogenasa contiene hierro y molibdeno; sus centros redox tienen un total de 2 Mo, 32 Fe y 30 S por tetrámero. Aproximadamente la mitad del hierro y del azufre se encuentra en dos centros 4Fe-4S conectados, denominados agregados P; el resto forma parte de un cofactor de hierro-molibdeno de un tipo nuevo. Se ha descubierto una forma de nitrógenasa que contiene vanadio en lugar de molibdeno; algunas especies de bacterias pueden producir ambos tipos de sistemas de nitrógenasa. El enzima de vanadio puede ser el sistema primario de fijación de nitrógeno en algunas condiciones ambientales, pero todavía no está tan bien caracterizado como el sistema dependiente de molibdeno.

La fijación del nitrógeno es llevada a cabo por una forma muy reducida de la dinitrogenasa que precisa ocho electrones: seis para la reducción del N_2 y dos para formar una molécula de H_2 como parte obligada del mecanismo de reacción. La dinitrogenasa se reduce por transferencia de electrones de la dinitrogenasa reductasa (Fig. 22-2). El tetrámero de la dinitrogenasa tiene dos sitios de unión para la reductasa. Los ocho electrones necesarios se transfieren a la dinitrogenasa de uno en uno: una molécula de reductasa reducida se une a la dinitrogenasa y le transfiere un único electrón y a continuación la forma oxidada de la reductasa se disocia de la dinitrogenasa

en un ciclo repetitivo. Cada vuelta del ciclo precisa la hidrólisis de dos moléculas de ATP por la reductasa dimérica. La fuente inmediata de electrones para reducir la dinitrogenasa reductasa es variable, pudiéndose usar **ferredoxina** reducida (p. 733; véase también Fig. 19-5), flavodoxina reducida y quizás otras fuentes. En al menos un caso, la fuente última de electrones para reducir la ferredoxina es el piruvato (Fig. 22-2).

El papel del ATP en este proceso es poco común. Recuerdese que el ATP puede proporcionar no sólo energía química, a través de la hidrólisis de uno o más de sus enlaces fosfoanhídridos, sino también energía de enlace (pp. 196, 301) mediante interacciones no covalentes que reducen la energía de activa-

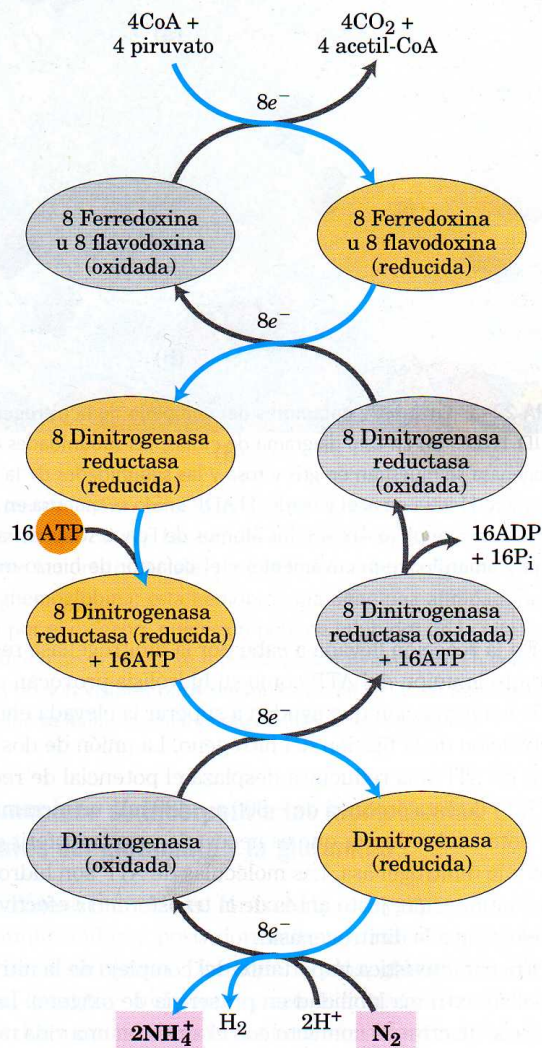


FIGURA 22-2 Fijación del nitrógeno por el complejo de la nitrógenasa. Los electrones se transfieren del piruvato a la dinitrogenasa a través de la ferredoxina (o flavodoxina) y la dinitrogenasa reductasa. La dinitrogenasa es reducida por la dinitrogenasa reductasa, captando los electrones de uno en uno, necesiándose al menos seis electrones para fijar una molécula de N_2 . Dos electrones más se utilizan para reducir 2H^+ a H_2 en un proceso que acompaña necesariamente a la fijación de nitrógeno en los sistemas anaeróbicos, lo que significa un total de ocho electrones por molécula de N_2 . Las estructuras de las subunidades y los cofactores metálicos de las proteínas dinitrogenasa reductasa y dinitrogenasa se describen en el texto y en la Figura 22-3.

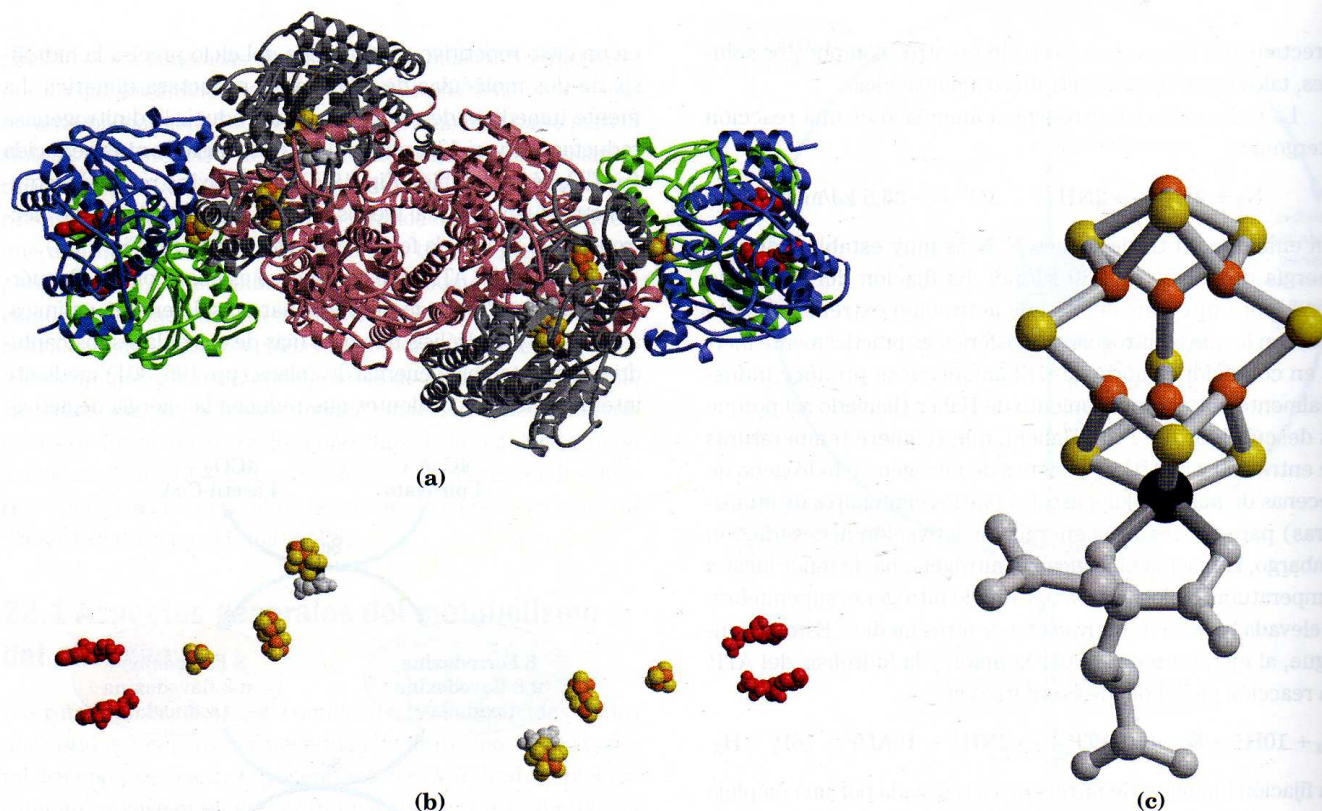


FIGURA 22-3 Enzimas y cofactores del complejo de la nitrogenasa. (PDB ID 1N2C) (a) En este diagrama de cintas, las subunidades de la dinitrogenasa se muestran en gris y rosa y las subunidades de la dinitrogenasa reductasa en azul y verde. El ADP unido se muestra en rojo. Obsérvese el complejo 4Fe-4S (los átomos de Fe y S se muestran en naranja y amarillo, respectivamente) y el cofactor de hierro-molib-

deno (Mo negro, homocitrato gris claro). También se muestran los agregados P (pares conectados de complejos 4Fe-4S). (b) Cofactores del complejo de la dinitrogenasa sin la proteína [los colores son como en (a)]. (c) El cofactor de hierro-molibdeno contiene 1 Mo (negro), 7 Fe (naranja), 9 S (amarillo) y una molécula de homocitrato (gris).

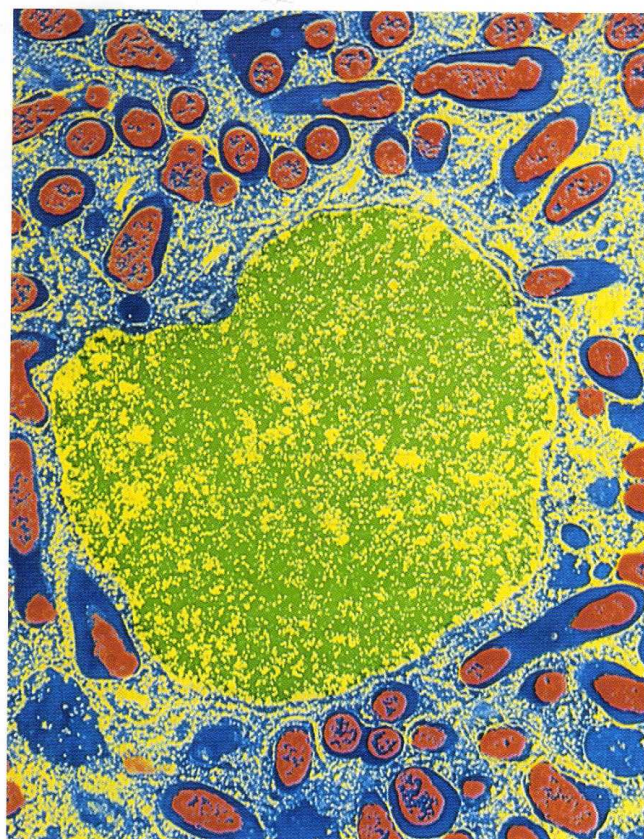
ción. En la reacción llevada a cabo por la dinitrogenasa reductasa tanto la unión del ATP como su hidrólisis provocan cambios de conformación que ayudan a superar la elevada energía de activación de la fijación del nitrógeno. La unión de dos moléculas de ATP a la reductasa desplaza el potencial de reducción (E'°) de esta proteína de -300 a -420 mV, un incremento de su potencial reductor que es necesario para transferir electrones a la dinitrogenasa. Las moléculas de ATP son hidrolizadas a continuación, justo antes de la transferencia efectiva de cada electrón a la dinitrogenasa.

Otra característica importante del complejo de la nitrogenasa es su extrema labilidad en presencia de oxígeno. La reductasa se inactiva en contacto con el aire, con una vida media de 30 segundos; la dinitrogenasa tiene una vida media de 10 minutos en contacto con el aire. Las bacterias libres que fijan nitrógeno solucionan este problema de diferentes maneras. Algunas viven solamente en condiciones anaeróbicas o reprimen la síntesis de la nitrogenasa en presencia de oxígeno. Algunas bacterias aeróbicas, tales como *Azotobacter vinelandii*, desacoplan parcialmente el transporte electrónico de la síntesis de ATP, de manera que el oxígeno es quemado tan pronto como entra en la célula (véase Recuadro 19-1). De hecho, cuando fijan nitrógeno, los cultivos de estas bacterias se calientan como resultado de sus esfuerzos para eliminar el oxígeno.

La relación simbiótica entre las plantas leguminosas y las bacterias fijadoras de nitrógeno en los nódulos de sus raíces (Fig. 22-4) resuelve a la vez las necesidades energéticas y la labilidad del complejo de la nitrogenasa frente al oxígeno. La energía necesaria para la fijación del nitrógeno fue probablemente la fuerza impulsora que a lo largo de la evolución condujo a esta asociación de plantas y bacterias. Las bacterias en los nódulos de las raíces tienen acceso a una gran reserva de energía en forma de glúcidos y de intermediarios del ciclo del ácido cítrico suministrados por la planta. Ello permite a las bacterias de los nódulos de las raíces fijar centenas de veces más nitrógeno que sus parientes próximos en las condiciones encontradas frecuentemente en los suelos. Para solventar el problema de la toxicidad del oxígeno, las bacterias de los nódulos de las raíces están impregnadas de una solución de una hemoproteína fijadora de oxígeno denominada **leghemoglobina**. Esta proteína es producida por la planta (aunque el grupo hemo puede ser proporcionado por la bacteria). La leghemoglobina fija todo el oxígeno a su alcance, de manera que éste no puede interferir en la fijación del nitrógeno y, a la vez, suministra eficazmente el oxígeno al sistema de transporte de electrones de la bacteria. El beneficio para la planta, por supuesto, es un suministro rápido de nitrógeno reducido. La eficiencia de la simbiosis entre los vegetales y las bacterias



(a)



(b)

FIGURA 22-4 Nódulos fijadores de nitrógeno. (a) Nódulos fijadores de nitrógeno en las raíces del trébol, una leguminosa. La flor de esta planta común se muestra en el inserto. (b) Micrografía electrónica coloreada artificialmente de un corte delgado de un nódulo de la raíz del guisante. Bacterias simbiotas fijadoras de nitrógeno, o bacteroides (en rojo), viven en el interior de las células de los nódulos, envueltas por la membrana peribacterioide (en azul). Los bacteroides producen el complejo de la nitrogenasa, que convierte el nitrógeno

atmosférico (N_2) en amonio (NH_4^+); sin los bacteroides la planta es incapaz de utilizar N_2 . Las células infectadas de la raíz proporcionan algunos factores esenciales para la fijación del nitrógeno, entre ellos la leghemoglobina; esta hemoproteína tiene una afinidad muy elevada por el oxígeno, que es un potente inhibidor de la nitrogenasa. (El núcleo de la célula se muestra en verde/amarillo. En esta micrografía no son visibles otros orgánulos de las células radicales infectadas, que se hallan normalmente en las células vegetales.)

resulta evidente por el enriquecimiento en nitrógeno del suelo propiciado por las plantas leguminosas. Este enriquecimiento es la base del procedimiento rotatorio de cosechas en el que el cultivo de plantas no leguminosas (tales como el maíz), que aprovechan el nitrógeno fijado presente en el suelo, se alterna cada pocos años con cultivos de leguminosas como la alfalfa, los guisantes o el trébol.

La fijación del nitrógeno es objeto de intensos estudios debido a su enorme importancia de carácter práctico. La producción industrial de amoníaco para su utilización en fertilizantes necesita mucha energía, lo que ha sido estímulo para los intentos de desarrollar organismos recombinantes o transgénicos que tengan la capacidad de fijar el nitrógeno. Las técnicas del DNA recombinante (Capítulo 9) están siendo utilizadas para transferir el DNA que codifica los enzimas de la fijación del nitrógeno a bacterias no fijadoras de nitrógeno y a plantas. El éxito en estos intentos depende de la solución del problema de la toxicidad del oxígeno en cualquier célula que produzca nitrogenasa.

El amoníaco se incorpora a las biomoléculas a través del glutamato y la glutamina

El nitrógeno reducido en forma NH_4^+ es incorporado primero a los aminoácidos y posteriormente a otras biomoléculas que contienen nitrógeno. Dos aminoácidos, **glutamato** y **glutamina**, constituyen el punto crítico de entrada. Recuérdese que estos dos mismos aminoácidos tienen un papel central en el catabolismo del amoníaco y de los grupos amino en la oxidación de los aminoácidos (Capítulo 18). El glutamato es la fuente de grupos amino de la mayor parte de los aminoácidos restantes, a través de reacciones de transaminación (la reacción inversa de la que se muestra en la Fig. 18-4). El nitrógeno del grupo amida de la glutamina es una fuente de grupos amino para una amplia gama de procesos biosintéticos. En la mayoría de tipos celulares, y de fluidos extracelulares en los organismos superiores, uno o ambos aminoácidos están presentes en concentraciones más elevadas, a veces un orden de magnitud o más, que los otros aminoácidos. Una célula de *Escherichia coli* ne-